(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

庁内整理番号

(11)特許出願公開番号

特開平8-43739

(43)公開日 平成8年(1996)2月16日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

FΙ

技術表示箇所

G 0 2 B 21/00

G01N 21/64

Ε

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 10 頁)

(21)出願番号

特願平7-125150

(22)出願日

平成7年(1995)5月24日

(31) 優先権主張番号 特願平6-109678

(32)優先日

平6 (1994) 5 月24日

(33)優先権主張国

日本(JP)

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 相方 隆

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 島田 佳弘

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(72) 発明者 李 政

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

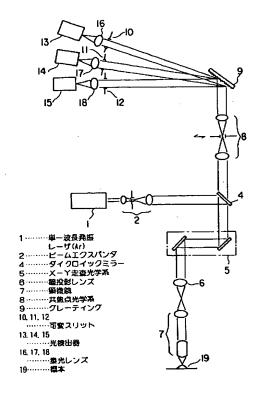
最終頁に続く

走查型光学顕微鏡 (54) 【発明の名称】

(57)【要約】

【目的】測光分離手段として波長依存性のあるフィルタ 類を使用することなく、多重染色時の蛍光クロスオーバ のないS/Nのよい蛍光検出の可能な走査型光学顕微鏡 を得る。

【構成】少なくとも単一波長以上のレーザビームを出射 し標本19に照射するレーザ光源手段(レーザ光源1, ピームエクスパンダ2,ダイクロイックミラー4,XY 走査光学系5, 瞳投影レンズ6, 顕微鏡7)と、標本1 9より発せられる蛍光を測光用光路上に配置されたグレ ーティング9と単一以上の可変幅スリット(10,1 1, 12) を経由してこのスリット10~12に該当す る光検出器13,14,15に導く測光分離手段を具備 したことを特徴とする走査型光学顕微鏡。



20

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも単一波長のレーザビームを走 査して標本に照射するレーザ光源手段と、

1

前記標本からの光を検出する検出光学系と、

前記標本からの光を結像する結像光学系と、

この結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、 この共焦点絞りを通過した蛍光を複数の波長に分ける少 なくとも1個のグレーティングと、

このグレーティングにより分光された前記標本からの光 を検出する光検出器と、

この光検出器に前記グレーティングからの導入される光 の幅を可変可能な少なくとも1個のスリットと、

を具備したことを特徴とする走査型光学顕微鏡。

【請求項2】 前記レーザ光源手段は少なくとも二波長 以上のレーザピームを出射し標本に照射することを特徴 とする請求項1記載の走査型光学顕微鏡。

【請求項3】 少なくとも単一波長のレーザビームを走 査して標本に照射するレーザ光源手段と、

前記標本からの光を検出する検出光学系と、

前記標本からの光を結像する結像光学系と、

この結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、 この共焦点絞りを通過した発散光を平行光線にするコリ メート光学系と、

このコリメート光学系の後方に配置され、所定の分光特 性で前記標本からの蛍光を分光する少なくとも 1 個のダ イクロイックミラーと、

このダイクロイックミラーで分光された標本からの光を 検出する光検出器と、

を具備したことを特徴とする走査型光学顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は単一以上の蛍光検出光学 系と蛍光観察光学系を具備した走査型光学顕微鏡に関す る。

[0002]

【従来の技術】

<第1従来例>従来、蛍光観察が可能な走査型光学顕微 鏡として、米国特許4997242号明細書に開示され ており、これは単一波長のレーザ光源を用いて単一、あ るいは二つの蛍光観察を行うもので、図7はその第1従 40 来例を説明するための図である。図7に示すように、レ ーザ発振器24から射出されたレーザビームは、以下に 述べる光学走査部材25により走査される。

【0003】すなわち、ピームスプリッタ23により反 射され、第1ガルバノメータスキャナを構成するガルバ ノメータ46aと平面鏡35a、および凹面鏡42a, 42 bならびにガルバノメータスキャナを構成するガル バノメータ46bと平面鏡35bにより2次元走査した のち顕微鏡を通して標本上に照射される。これによって 標本に発した蛍光は逆の光路をたどり、ピームスプリッ 50 構成したものである。すなわち、図8のダイクロイック

タ32を通過したのち、単一蛍光時はフォトマルチプラ イヤ30へ、また二つの蛍光時はビームスプリッタ32 により分光され、各々フォトマルチプライヤ30、フォ トマルチプライヤ34によって検出される。なお、以上 述べた構成以外に、接眼レンズ27、アイリス用ダイヤ フラム31,33を備えている。

【0004】このような構成のものにおいて、図示しな い標本からの蛍光は、接眼レンズ27、平面鏡35b、 凹面鏡42a、42bを反射した後、平行光線となり、 10 平面鏡 3 5 a で反射され、アイリス用ダイヤフラム 3 1,33を通過してフォトマルチプライヤ30,34で 検出される。

【0005】以上述べた第1従来例の結像光学系は、ダ

イヤフラム31,33から凹面鏡42aまでの光路を大

きくとることによって、共焦点効果が得られる。対物レ

ンズが焦点位置の時に標本からの蛍光は、凹面鏡42 a からフォトマルチプライヤ34までの間で平行光線にな るので、フォトマルチプライヤ34に導かれる光ビーム 直径は、ダイヤフラム31、33の直径で決定される。 【0006】<第2従来例>図8に示すように、レーザ 光源1からのレーザビームは、適宜なるビーム直径に拡 大するための光学系であるビームエキスパンダ2を通 り、ビーム直径を拡大した後、レーザ波長を選択するた めのレーザラインフィルタ3でレーザ波長を選択してダ イクロイックミラー4で反射され、ガルバノミラー等の X-Y走査光学系5でXY偏光され、瞳レンズ6、顕微 鏡7を介してレーザビームは標本19上に照射され、標

【0007】これにより励起された標本19からの蛍光 30 は、顕微鏡7からのダイクロイックミラー4に至る経路 を戻り、ダイクロイックミラー4を通過した光は、ダイ クロイックミラー64で分光され、一方は結像レンズ7 1を通り、共焦点絞り74を通って光検出器15で検出 される。

本19をビーム走査することになる。

【0008】同様に、他方はダイクロイックミラー65 で分光され、結像レンズ72を通り、共焦点絞り75を 通って光検出器14で検出され、またダイクロイックミ ラー65を通過した蛍光は、ミラー66で反射され、結 像レンズ73を通り、共焦点絞り76を通って光検出器 13で検出される。

【0009】以上述べた第2従来例は、結像レンズ71 の焦点距離 f と共焦点絞り 7 4 へ光検出器 1 5 までの距 離1を適当に設定することにより、光検出器15の受光 領域に標本19からの蛍光を導くことができる。 同様 に、結像レンズ72, 73の焦点距離fと共焦点絞り7 5,76へ光検出器14,13までの距離1を適当に設 定することにより、光検出器14,13の受光領域に標 本19からの蛍光を導くことができる。

【0010】〈第3従来例〉図9は図8を以下のように

ミラー64,65と光検出器15,14の間にそれぞれ 配設されている結像レンズ71,72と共焦点絞り74,75ならびにミラー66と光検出器13の間に配設 されている結像レンズ73と共焦点絞り76を設けず、 ダイクロイックミラー4と64の間に結像レンズ77と 共焦点絞り78を設けたものである。

【0011】このように第3従来例のように構成にすると、図8と同様な機能が得られると共に、図8の従来例に比べて装置が簡単になり、コストダウンとなる。
〈第4従来例〉また、従来、蛍光検出が可能な走査型光 10 学顕微鏡として、米国特許5127730号明細書に開示されており、これは複数の波長のレーザ光源を用いて、2つの蛍光を検出するもので、図10はその第4従来例を説明するための図である。レーザ光源50として、488nm,568nm,647nmのレーザ光を同時発振するKr-Arレーザ光源50を用いている。

【0012】レーザ光源50より発振された3つの波長のレーザ光51は、励起フィルタ52のデュアルバンドパスフィルタ52aで488nmと568nmの2つとなり、デュアルダイクロイックミラー54により図の下方の対物レンズ(図示せず)を介して蛍光標本55に導かれる。標本55から蛍光として発光された2種類の波長は、前記対物レンズ、デュアルダイクロイックミラー54を透過し反射鏡56で反射され、フィルタブロック57に導かれる。そして、フィルタブロック57に有する測光用ダイクロイックミラー57aにより、1つ1つの波長に分光されフィルタ57bおよび57cをそれぞれ介してフォトマルチプライヤ(PMT)58及び59により検出される。

【0013】このように、図10に示す走査型光学顕微 30 鏡によれば、複数の波長を発振するマルチラインレーザ 光源を組み合わせて、2重励起観察を行うことができ

<第5従来例>一方、第5従来例には、3つの蛍光を検出する走査型光学顕微鏡が開示され、図11はこれを説明するための図である。レーザ光源160より発振された488nmと514nmのレーザピーム161は、エクスターナルフィルタ162により、どちらか1つの波長のみが透過される。

【0014】そして、ビームスプリッタ163により、 図示下方に反射されXYスキャニングユニット164を 通り、光学顕微鏡内の接眼レンズ166および対物レン ズ167を通り標本165に集光される。この場合、標 本165面はスキャニングユニット164で、標本16 5面を2次元に走査される。すると、標本165より発 光した蛍光は、対物レンズ167、接眼レンズ166、 スキャニングユニット164を通る。

【0015】そして、ビームスプリッタ163を透過し、2波長測光の場合はビームスプリッタ168により分光され、この一方はフォトマルチプライヤ174に導 50

かれ、ビームスプリッタ168の他方の分光はビームスプリッタ169により分光され、この一方はフィルタ172を介してフォトマルチプライヤ173により検出され、ビームスプリッタ169の分光の他方はフィルタ170を介してフォトマルチプライヤ171により検出される。

【0016】このようにして標本165に適宜、照射されたレーザ光161からの蛍光はピームスプリッタ163を通過し、ピームスプリッタ168及び169により分光され、各々、フォトマルチプライヤ171,173,174によって検出される。

【0017】近年、蛍光観察においては、単染色のみならず、多重染色が多用されている。もとより蛍光染色は細胞、組織内の特定対象を可視化(特異性)する為に行う。故に多重染色時は各々の染色部位が明確な色の差、即ち蛍光波長の違いとして標識されなければならない。

【0018】ところで蛍光染色には極めて多種の方法があり、多重染色を行うと蛍光波長に部分的な重なり部分(クロスオーバ部分)が生じることがあり、図12はそ20 れを示している。

[0019]

【発明が解決しようとする課題】前述した第1従来例では、凹面鏡42a,42bからダイアフラム31,33までの光路長を、共焦点効果を得るために、大きく取らねばならないので、装置が大型化する。さらに第1従来例を小型化するために、図7のミラー100a,100b,100cのように反射させねばならないが、これは光量をロスする原因になる。

【0020】図8の第2従来例では、各チャンネルに共 焦点絞り74~76および結像レンズ15,14,13 を必要とするので、装置が複雑になり、コスト高とな る。図9の第3従来例では、ダイクロイックミラー6 4,65を配置し、3チャンネル構成となっているの で、光検出器14は15よりも光路長が大きくなり、ま た光検出器13は14よりも光路長が大きくなる。従っ て、光検出器13,14の受光領域に光ビームが完全に 導かれなくなる。

【0021】図9の第3従来例では、光検出器15,14,13の受光領域にロスなく標本19からの蛍光を導くには、結像レンズ77の焦点距離fを大きくしなければならない。しかし、焦点距離fを大きくすると、装置が大型化するという欠点がある。

【0022】また図10の第4従来例または図11の第5従来例では、これら多重染色による複数の蛍光波長を分割する手段として、ビームスプリッタ(ダイクロイックミラー)54または163を使用し、更に検出する蛍光波長を限定する為に、様々な種類のシャープカットフィルタやバンドパスフィルタ52a,52b,52c、57a,57b,57cまたは168,169,170,172を使用する必要がある。これらは使用するレ

5

ーザ波長や蛍光染色に合わせ、その都度準備する必要もある。

【0023】一般的に、これらの波長依存性のあるフィルタ類52a~52c、57a~57c、168~170,172は非線形性であり、蛍光波長のクロスオーバを取り除こうとすると、蛍光量のかなりの部分を検出する前に捨て去ることとなる。このことにより、検出のS/Nが落ちる。また染色の種類によっては蛍光波長のクロスオーバが大きいものも存在する。従って、前述した第4従来例または第5従来例では該検出そのものが不可10能となる。

【0024】本発明の第1の目的は前記不具合を解消し、多重染色時の各々の蛍光波長を検出するための波長依存性のあるフィルタ類を使用することなく、S/Nの良い検出を行うことができる走査型光学顕微鏡を提供することにある。

【0025】本発明の第2の目的は前記不具合を解消し、標本を反射して得られる蛍光を光検出器に口スなく 導くことができ、しかも小型で安価となる走査型光学顕 微鏡を提供することにある。

[0026]

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、請求項1に対応する発明は、少なくとも単一波長のレーザピームを走査して標本に照射するレーザ光源手段と、前記標本からの光を検出する検出光学系と、前記標本からの光を結像する結像光学系と、この結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、この共焦点絞りを通過した蛍光を複数の波長に分ける少なくとも1個のグレーティングと、このグレーティングにより分光された前記標本からの光を検出する光検出器と、この光検出器に前記グレーティングからの導入される光の幅を可変可能な少なくとも1個のスリットと、を具備したことを特徴とする走査型光学顕微鏡である。

【0027】前記目的を達成するため、請求項2に対応する発明は、前記レーザ光源手段として少なくとも二波長以上のレーザピームを出射し標本に照射することを特徴とする請求項1記載の走査型光学顕微鏡である。

【0028】前記目的を達成するため、請求項3に対応する発明は、少なくとも単一波長のレーザビームを走査して標本に照射するレーザ光源手段と、前記標本からの40光を検出する検出光学系と、前記標本からの光を結像する結像光学系と、この結像光学系の焦点位置に配置された共焦点絞りと、この共焦点絞りを通過した発散光を平行光線にするコリメート光学系と、このコリメート光学系の後方に配置され、所定の分光特性で前記標本からの蛍光を分光する少なくとも1個のダイクロイックミラーと、このダイクロイックミラーで分光された標本からの光を検出する光検出器を具備したことを特徴とする走査型光学顕微鏡である。

[0029]

【作用】請求項1に対応する発明によれば、単一波長のレーザピームを標本に照射し、標本からくる蛍光が測光分離手段により分離され、かつ光検出器によって検出されるので、S/Nが良く、蛍光波長の分離ができる。

【0030】請求項2に対応する発明によれば、二波長以上のレーザピームを標本に照射し、標本からくる蛍光が測光分離手段により分離され、光検出器によって検出されるので、請求項1に対応する発明に比べて更に多様な蛍光波長の分離ができる。

【0031】請求項3に対応する発明によれば、少なくとも1つのダイクロイックミラーで標本を反射して得られる蛍光を光検出器にロスなく導くことができ、しかも小型で安価となる。

[0032]

【実施例】以下、本発明の実施例について図面を参照して説明する。

〈第1実施例〉図1は本発明の走査型光学顕微鏡の第1 実施例の光学系を示す図である。本実施例は、レーザ光 源1は単一波長例えば488nmのレーザビームを出射 し、標本19に照射する。レーザ光源1からのレーザ光 は、後述するレーザ光源手段および測光分離手段に導か れる。レーザ光源手段はビームエクスパンダ2、ダイク ロイックミラー4、X-Y走査光学系5、瞳投影レンズ 6、顕微鏡7を順次介して標本19に導くように構成さ れている。

【0033】また測光分離手段は、標本19からの蛍光をダイクロイックミラー4にて分離したのち、共焦点光学系8、グレーティング9、幅を変更可能なスリット10、11、12、集光レンズ16、17、18、光検出器13、14、15からなっている。

【0034】このような構成のものにおいて、標本19から発した蛍光は、顕微鏡7から共焦点光学系8を通過したのち、グレーティング9に至る。勿論この時、共焦点光学系8をパイパスさせることも可能である。グレーティング9に至った蛍光はその波長に合わせ、0次~n次光に分けられる。これらの各次光には各々スリット10、11、12、集光レンズ16、17、18、光検出器13、14、15が対応する。各々、スリット10、11、12の幅を変化させることで、検出する各々の蛍光波長範囲が変更可能となる。

【0035】以上述べた第1実施例によれば、測光分離 手段としてダイクロイックミラー、シャープカットフィ ルタ、パンドパスフィルタ等の波長依存性のあるフィル タ類を使用することがないので、多重染色時の蛍光クロ スオーバのないS/Nのよい検出が可能になる。

【0036】〈第2実施例〉図2は、本発明の第2実施例の光学系を示す図であり、前述の第1実施例のビームエクスパンダ2とダイクロイックミラー4の間の光路上に、新たにダイクロイックミラー22およびレーザラインフィルタ3を設け、さらにダイクロイックミラー22

には、単一あるいは複数波長同時発振レーザ光源20からのレーザ光をピームエクスパンダ2に拡大して照射する構成ように構成されている。これ以外のダイクロイックミラー4で反射された後、検出器13,14,15に至るまでの構成は第1実施例と同一である。

【0037】レーザ光源20としては、488nm、5 68nmのArーKrレーザ光源、351nmのArレ ーザ光源を組合わせたものを用いる。以上述べた第2実 施例も、前述の第1実施例と同様な作用効果が得られ る。すなわち、レーザ光源1,20からの二波長以上の10 レーザビームを標本19に照射し、標本19からくる蛍 光がグレーティング9により分離され、光検出器13, 14, 15によって検出されるので、S/Nが良く、第 1 実施例に比べて更に多様な蛍光波長の分離ができる。 【0038】〈第3実施例〉図3は、本発明の第3実施 例の光学系を示す図であり、前述の第1実施例のレーザ 光源1を、例えば351nm, 458nm, 488n m. 514. 5 n m のマルチラインA r レーザ光源から なる複数波長同時発振レーザ光源21に変更し、ビーム エクスパンダ2とダイクロイックミラー4の間に、レー ザラインフィルタ3を設けたものであり、これ以外の構 成は前述の第1実施例と同一である。

【0039】第3実施例によれば、レーザ光源21からの二波長以上のレーザビームを標本19に照射し、標本19からくる蛍光がグレーティング9により分離され、光検出器13,14,15によって検出されるので、S/Nが良く、第1実施例に比べて更に多様な蛍光波長の分離ができる。

【0040】〈第4実施例〉図4は、本発明の第4実施例の光学系を示す図であり、図1の実施例と異なる点は、以下のように構成したものである。すなわち、標本19からの反射光を集光する結像レンズ61と、結像レンズ61の結像位置に配置された共焦点絞り62と、この共焦点絞り62を通過する発散光(拡がり角をもつビーム)を平行光線にするコリメート光学系63と、このコリメート光学系63の後方に配置され、所定の分光特性で標本19からの蛍光を分光する2個のダイクロイックミラー64、65と、ダイクロイックミラー65の後方に配置され、ダイクロイックミラー65から得られる分光を反射して光検出器13に導くミラー66を設けたものである。

【0041】このような構成のものにおいて、コリメート光学系63により、共焦点絞り62を通過した光(拡散光)は平行光に変換される。従って、共焦点絞り62を通過した後の光を所定の波長毎に分光して異なる複数の波長の光をそれぞれの光検出器15,14ならびに13によって測光することができる。

[0042] この場合、共焦点絞り62からどのような 可能な走査型光学顕微鏡を提供できる。また、本発明に 距離に光検出器15,14,13を配置しても、測定光 よれば、標本を反射して得られる蛍光を光検出器にロス 束はコリメート光学系63により平行光に変換されるこ 50 なく導くことができ、しかも小型で安価となる走査型光

とから、全光量がロスなく、ダイクロイックミラー64,65、ミラー66を介して光検出器15,14ならびに13に入射する。従って、ダイクロイックミラー64,65、光検出器15,14ならびに13は、光学上の制約を受けることなく、自由に配置できる。

【0043】〈第5実施例〉図5は、本発明の第4実施例の光学系を示す図であり、図4のコリメート光学系63を、以下のようなコリメート光学系67としたものである。すなわち、コリメート光学系67は、片面が平面の凸レンズ、片面が球面上の凸レンズとし、かつこの凸レンズの平面側の面に図示しない蒸着膜にピンホールを形成したものである。

【0044】 このように構成することにより、コリメート光学系67を通過した光ピームは平行光線になり、ダイクロイックミラー64, 65で分光され、光検出器15, 14ならびに13に受光領域から外れることなく導かれる。

【0045】コリメート光学系67は、共焦点絞りを兼ねているので、小型でかつ安価にできる。

〇 〈第6実施例〉図6(a)は、本発明の第6実施例の光学系を示す図であり、図5の実施例のコリメート光学系67を、凸レンズ67aと凹レンズ67bの組み合わせたものとし、測光分離手段はグレーティング9で構成し、さらに光の幅を変更可能なスリット10,11,12、集光レンズ16,17,18、光検出器13,14,15から構成したものである。

【0046】このような構成のものにおいて、図示しない標本から発した蛍光は、図示しない顕微鏡、瞳投影レンズ、XーY走査光学系、ダイクロイックミラーを通過し、結合レンズ61、共焦点絞り62、コリメート光学系67を通ってグレーティング9に至る。蛍光は、その波長に合わせ、0次~n次光に分けられる。これらの各次元には、各々スリット10~12、集光レンズ16~18、光検出器13~15が対応する。各々、スリット10~12の幅を変化させることで、検出する各々の蛍光波長範囲が変更可能となる。

[0048]

【発明の効果】本発明によれば、測光分離手段として波 長依存性のあるフィルタ類を使用することなく、多重染 色時の蛍光クロスオーバのないS/Nのよい蛍光検出の 可能な走査型光学顕微鏡を提供できる。また、本発明に よれば、標本を反射して得られる蛍光を光検出器にロス なく導くことができ、しかも小型で安価となる走査型光 学顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の走査型光学顕微鏡の第1実施例を示す図。

【図2】本発明の走査型光学顕微鏡の第2実施例を示す図。

【図3】本発明の走査型光学顕微鏡の第3実施例を示す図。

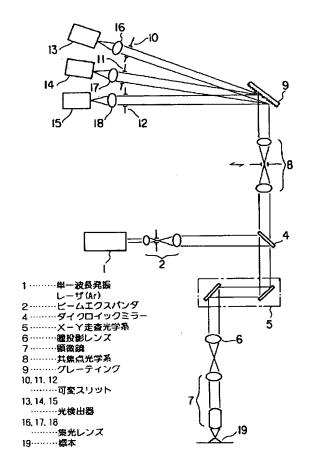
【図4】本発明の走査型光学顕微鏡の第4実施例を示す 図

【図5】本発明の走査型光学顕微鏡の第5実施例を示す図。

【図 6 】本発明の走査型光学顕微鏡の第 6 実施例を示す 図。

【図7】第1従来例を示す図。

【図1】



【図8】第2従来例を示す図。

【図9】第3従来例を示す図。

【図10】第4従来例を示す図。

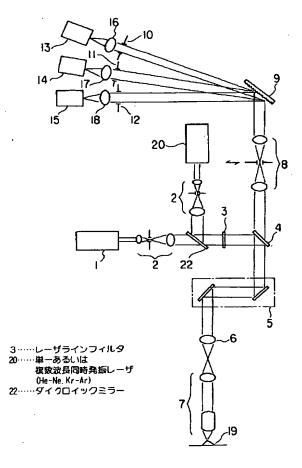
【図11】第5従来例を示す図。

【図12】 蛍光のクロスオーバを示す図。

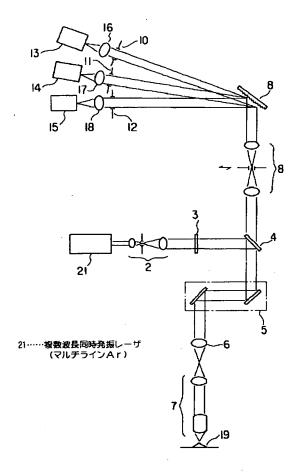
【符号の説明】

1…単一波長発振レーザ光源、2…ビームエクスパンダ、4…ダイクロイックミラー、5…XY走査光学系、6…瞳上投影レンズ、7…顕微鏡、8…共焦点光学系、9…グレーティング、10,11,12…可変スリット、13,14,15…光検出器、16,17,18…集光レンズ、19…標本、21,29…レーザ光源、61…結像レンズ、62…共焦点絞り、63,67…コリメータ光学系、64,65…ダイクロイックミラー、66…ミラー。

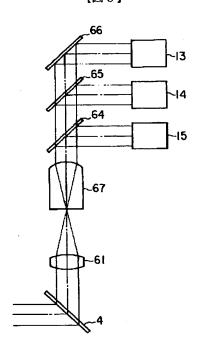
[図2]



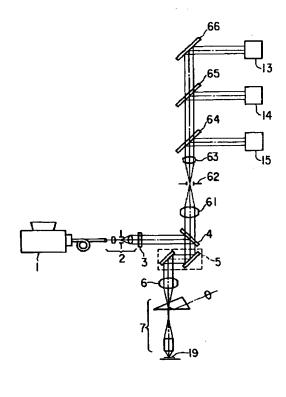




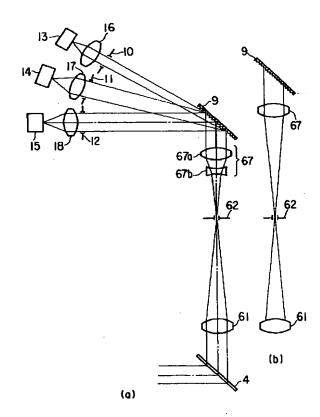
【図5】

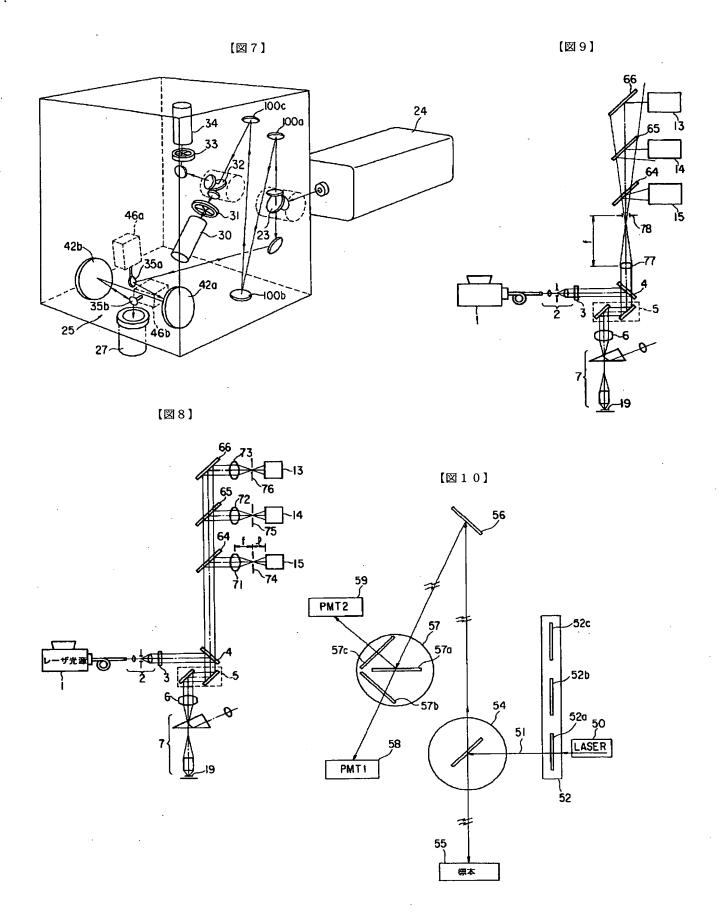


【図4】

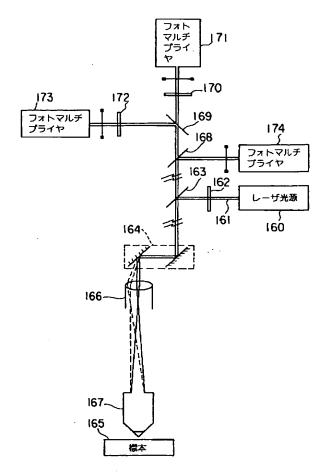


[図6]

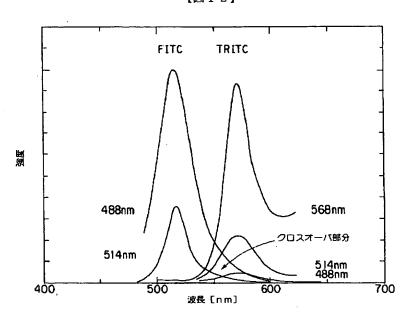




[図11]



[図12]



フロントページの続き

(72)発明者 佐々木 浩 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ ンパス光学工業株式会社内